

(11)特許出願公表番号

(43)公表日 平成10年(1998)1月27日

審查請求 未請求 予備審查請求 有 (全 25 頁)

最終頁に続く

FIG. 1A.

【特許請求の範囲】

1. (a) 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(b) 上記 (a) のDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成するが、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグセリンプロテアーゼをコードするDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成する単離DNAと、

(c) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b) の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAとから成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNA。

2. 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼ酵素をコードしている請求項1記載の単離DNA。

3. 図1のDNA配列を持つ請求項1記載の単離DNA。

4. ベクターDNAと、ケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項1の単離DNAとを含む組換えDNA分子。

5. 請求項4記載の組換えDNAを含み、コードされているタンパク質を発現できる宿主細胞。

6. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項5記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

7. (a) 図1のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしている単離DNAと、

(b) 60℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄

の厳密さによって表される条件で、上記 (a) の単離DNAとハイブリッド形成し、上記 (a) の単離DNAと少なくとも65%が相同であり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(c) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b)

) の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコード化している単離DNAとから成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNA。

8. ベクターDNAと、ケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項7記載の単離DNAを含む組換えDNA分子。

9. 請求項8記載の組換えDNAを含み、コードされているタンパク質を発現できる宿主細胞。

10. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項9記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1の
ケラチナーゼをコードしているDNA

本発明は、USDA（米国農務省）からの補助金による政府援助を受けた。政府は
本発明に対し特定の権利を有する。

技術分野

本発明は、バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1
のケラチナーゼをコードしているDNAに関し、羽毛等のケラチンを分解し、それ
からアミノ酸を生成するのに有効なケラチナーゼの製造に役立つものである。

発明の背景

羽毛は、家禽産業によって大量に生産される。これらの羽毛は、利用範囲の広
い原材料の安価な供給源である。数ある中で、動物飼料のアミノ酸と消化性タン
パク質の安価な供給源として利用できるように、羽毛の分解方法の開発に大きな
関心が寄せられてきた。現在までに開発されている羽毛を動物飼料に変換する方
法には、蒸気による加水分解処理法と蒸気による加水分解処理と酵素処理を組み
合わせた方法がある。Papadopoulos, M.C., Animal Feed Science and Technolo
gy 16:151 (1986)、Papadopoulos, M.C., Poultry Science 64:1729 (1985)、
Alderibigde, A.O. et al., J. Animal Science 1198 (1983)、Thomas and Bee
son, J. Animal Science 45:819 (1977)、Morris et al., Poultry Science 52:
858 (1973)、Moran et al., Poultry Science 46:456 (1967)、Davis et al.
、Processing of poultry by-products and their utilization in feeds, Part
I, USDA Util. Res. Rep. no.3, Washington, D.C. (1961) 参照のこと。これ
らの方法には、蒸気処理により熱に弱いアミノ酸が分解されたり、生成物の

消化性が比較的低い等の欠点があったことから、過酷な蒸気処理を必要としない
経済的で新しい羽毛分解法に対する関心は薄れなかった。従って、本発明の目的
は、蒸気加水分解に依存しないケラチンに富む材料の加水分解法を提供すること
である。

更なる目的は、ケラチンに富む材料を高いアミノ酸収率でアミノ酸に変換する

方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、消化性が高く、食物タンパク質およびアミノ酸の良質な供給源となる飼料成分として有用な羽毛の加水分解生成物を提供することである。

本発明の更なる目的は、飼料中のケラチンとその他のタンパク質の消化性を改善するための飼料添加物として利用可能なケラチナーゼ酵素を提供することである。

本発明の更なる目的は、食物アミノ酸源として羽毛の加水分解生成物を利用した経済的な動物飼料を提供することである。本発明の前記およびその他の目的と本発明の点は下記の概要、詳細な説明、例に詳細に説明されている。

発明の概要

本発明の第一の点は、

(a) 図1 (配列番号1) のバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1 (ATCC Accession No. 53757) のケラチナーゼをコードしている単離DNAと、

(b) 60℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄の厳密さによって表される条件で、上記 (a) の単離DNAとハイブリッド形成し、上記

(a) の単離DNAと少なくとも65%が相同であり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと、

(c) 上記 (a) のDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成するが、

バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグセリンプロテアーゼ (バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1の前記プロテアーゼはその変異型に思われる) をコードするDNAと同じハイブリッド形成条件でハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドプローブとハイブリッド形成する単離DNAと、

(d) 遺伝子コードの縮重によりヌクレオチド配列が上記 (a) および (b) の単離DNAと異なり、かつケラチナーゼ酵素をコードしている単離DNAと

から成るグループから選択されるケラチナーゼをコードしている単離DNAである。

本発明の第二の点は、ベクターDNAとケラチナーゼ酵素をコードしている上記に示すDNAを含む組換えDNA分子である。

本発明の第三の点は、上記の組換えDNA配列を含み、コードされたケラチナーゼ酵素を発現できる宿主細胞である。

本発明の第四の点は、コードされたケラチナーゼを発現できる条件で上記宿主細胞を培養し、発現されたケラチナーゼを収集することによるケラチナーゼ酵素製造方法である。

本発明の前記およびその他の点は、下記の図、具体例、詳細な説明に詳しく説明されている。

図面の簡単な説明

図1は、バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1のケラチナーゼをコードしている単離DNAの配列とコードされているアミノ酸配列を示す図である。更に、図1は、バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1とバチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグ遺伝子をコードしているアミノ酸の違いも示している。

発明の詳細な説明

本明細書に開示されているアミノ酸配列は左から右に、アミノ末端からカルボキシル末端の方向に表示されている。アミノ基とカルボキシル基は配列に表示されていない。ヌクレオチド配列は左から右に5'から3'の方向に一本鎖のみによって本明細書に表示されている。ヌクレオチドとアミノ酸は、37CFR1.822と確立された利用法に準じて、IUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨される方法で、あるいは（アミノ酸に関しては）3文字コードにより表されている。例えば、PatentIn User Manual, 99-102 (1990年11月) (米国特許商標庁、Office of the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231) ; Hudson et al.の米国特許第4,871,670号、3欄の20~43行目を参照すること（本明細書に引

用されたこれらの文献は、引用することによって本明細書中に組み込むことを出願人は意図している)。

A. ケラチナーゼ酵素をコードしているDNA

DNAは、羽毛のようなケラチン供給源を分解するケラチナーゼ酵素をコードしている。この定義は、このDNAの天然の対立遺伝子の変異を含むことを意図している。ケラチナーゼの発現をコードしているその他のDNA配列と上記DNA配列とのハイブリッド形成が可能なハイブリッド形成条件は、一般に高度に厳密な (stringency) 条件である。例えば、このような配列は、60℃または70℃で0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDSの洗浄の厳密さによって表される条件で、標準的な in situ ハイブリッド形成分析において本明細書に開示されているDNAとハイブリッド形成することができる。J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第二版、1989年) (Cold Spring Harbor Laboratory) を参照。一般に、ケラチナーゼをコードしており、かつ本明細書に開示されているバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) PWD-1のケラチナーゼをコードしているDNA配列とハイブリッド形成するDNA配列は、本明細書に開示されているケラチナーゼの配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%あるい

は95%以上相同である。

更に、前記配列によりコードされているものと同じケラチナーゼをコードしているが、遺伝子コードの縮重によりこれらとはコドン配列が異なるDNA配列 (またはオリゴヌクレオチド) も本発明の一面をなす。遺伝子コードの縮重は、異なる核酸配列により同じタンパク質またはペプチドをコードするものであるが、文献にて公知である。例えば、Toole et al. の米国特許第4,757,006号、2欄、表1を参照。

前記配列によりコードされているものと同じケラチナーゼをコードしているが、部位指定変異誘起法によりこれらとはコドン配列が異なるDNA配列 (またはオリゴヌクレオチド) も本発明の更なる一面をなす。ケラチナーゼ酵素の特性の改善に有用な部位指定突然変異誘起法は、下記に説明されているように公知である

。Kunkelの米国特許第4,873,192号を参照。

B. 遺伝子工学技術

遺伝子工学によるクローン化遺伝子、組換えDNA、ベクター、形質転換宿主細胞、タンパク質およびタンパク質断片の作製法は公知である。Bell et al. の米国特許第4,761,371号の6欄3行目から9欄65行目、Clark et al. の米国特許第4,877,729号の4欄38行目から7欄6行目、Schilling et al. の米国特許第4,912,038号の3欄26行目から14欄12行目、Wallner et al. の米国特許第4,879,224号の6欄8行目から8欄59行目を参照。

ケラチナーゼをコードしているDNAは公知の技術のいずれによっても作製できる。例えば、このDNAは、BIO-RAD社のMJTA-GENE™ Phagemid in vitro突然変異誘発キットを使用して構成することができる。このキットは、米国特許第4,873,192号においてKunkelにより報告されている方法に基づいている。(T. Kunkel, Proc Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)、T. Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154:367 (1987) も参照)。米国特許第4,873,192号は、二本鎖DNAの非突然

変異鎖に対する非常に強い選択法を提供する。DNAがdut ung 二重突然変異細菌の中で合成されると、新生DNAはdut突然変異の結果、チミンの位置に多くのウラシルを持ち、それによって酵素dUTPaseを不活化し、細胞内dUTP濃度が高くなる。ung突然変異はウラシルN-グリコシラーゼを不活化し、取り込まれたウラシルはDNAの中に残存できる。次に、このウラシルを含む鎖を、所望の突然変異を含むオリゴヌクレオチドによってプライム（開始）される相補鎖のin vitro合成の鋳型として利用する。得られた二本鎖DNAは能率的なウラシルN-グリコシラーゼを有する細胞内に形質転換され、ウラシルを含む鎖は高い効率で不活化され、ウラシルを含まない残存物質が残り、複製される（一般的な情報はBIO-RADカタログ番号170-3576使用マニュアルを参照）。

ケラチナーゼと調節要素をコードしているDNAを含むケラチナーゼ遺伝子は、選択された、あるいは標的となる核酸配列の増幅により構成される。増幅は適切な手段のいずれによっても実施できる。一般的には、D. Kwok and T. Kwok, Am

Biotechnol. Lab. 8:14 (1990) を参照。適切な増幅技術の例としては、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅（一般的には、G. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392 (1992)、G. Walker et al., Nucleic Acids Res. 20:1691 (1992) 参照）、転写に基づく増幅（D. Kwok et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989) を参照）、自己保持配列複製（または「3SR」）（J. Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874 (1990) 参照）、 $Q\beta$ レプリカーゼ系（P. Lizardi et al., Biotechnology 6:1197 (1988) 参照）、核酸配列に基づく増幅（または「NASBA」）（R. Lewis, Genetic Engineering News 12 9:1 (1992) 参照）、修復連鎖反応（すなわち「RCR」）（上記 R. Lewis 参照）、およびブーメラン DNA 増幅（すなわち「BDA」）（上記 R. Lewis 参照）が含まれるが、これらに限定されない。

前記のような DNA 増幅技術には、目的の標的タンパク質をコードしている DNA に

特異的に結合するプローブ、1 対のプローブまたは 2 対のプローブが含まれる場合がある。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、公知の技術によって実施できる。例えば、米国特許第 4,683,195 号、第 4,683,202 号、第 4,800,159 号および第 4,965,188 号を参照。一般に、PCR は、まずハイブリッド形成条件下に、検出すべき特異的配列の各鎖に対するあるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて（例えば熱に安定な DNA ポリメラーゼの存在下に）核酸試料を処理すると、各核酸鎖に相補的な各プライマーの伸長生成物が合成される。プライマーはハイブリッド形成する特異的配列に十分に相補的であり、各プライマーから合成される伸長生成物は、その相補体から単離された場合には、もう一方のプライマーの伸長生成物合成の鋳型として利用できる。次に、検出すべき配列が存在する場合には、変性条件で試料を処理し、プライマー伸長生成物をそれらの鋳型から単離する。これらの段階は、目的の増幅量が得られるまで、周期的に反復される。増幅配列の検出は、反応生成物とハイブリッド形成できるオリゴヌクレオチドプローブ（例えば、本発明のオリゴヌクレオチドプローブ）を反応生成物に加えることによって実施でき、そのプローブとしては、検出可能な標識を付けたプローブを用いる。次に公知の技

術によって、あるいはゲル上で直接視認により標識を検出する。

リガーゼ連鎖反応 (LCR) も、公知の技術に従って実施される。例えば、R. Weiss, Science 254:1292 (1991) を参照。一般に、反応は2対のオリゴヌクレオチドプローブを用いて実施され、1対は検出されるべき配列の1本の鎖に結合し、もう1対は検出されるべき配列のもう1本の鎖に結合する。各対は共にその対応する鎖に完全に重なる。反応は、まず検出されるべき配列の鎖を変性させ (例えば単離し)、次に熱に安定なリガーゼの存在下に鎖を2対のオリゴヌクレオチドプローブと反応させ、オリゴヌクレオチドプローブの各対を共に結合させる。次に反応生成物を単離し、目的の量まで配列が増幅されるまでこの工程を周期的に

反復する。次に、PCRに関して記述されている方法により検出することができる。

ベクターは、複製可能なDNA構成物である。ベクターは、本明細書に示されるケラチナーゼをコードしているDNAを増幅するか、および/または本明細書に示されるケラチナーゼをコードしているDNAを発現するために使用される。発現ベクターは、複製可能なDNA構成物であり、ケラチナーゼをコードしているDNA配列が適切な宿主内でケラチナーゼを発現する適切な調節配列に操作可能なように結合されている。このような調節配列の必要性は、選択される宿主および選択される形質転換法によって異なる。一般に、調節配列には、転写プロモーター、転写を調節する選択されたオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、転写および翻訳の終結を調節する配列が含まれる。

増幅ベクターは発現調節領域を必要としない。必要とされるのは、通常は複製起点によって賦与される宿主内複製能と、形質転換細胞の確認を促進する選択遺伝子だけである。

ベクターには、プラスミド、ウイルス (例えばアデノウイルス、サイトメガロウイルス)、ファージ、組み込み可能なDNA断片 (すなわち、組換えにより宿主ゲノムの中に組み込むことができる断片) が含まれる。ベクターは、宿主ゲノムとは独立に複製され、機能する。あるいは場合によってはゲノムそのものに組み

込まれる。発現ベクターは、発現されるべき遺伝子に操作可能なように結合し、宿主生物内で操作可能なRNA結合部位とプロモーターとを含まなくてはならない。

DNA領域は、機能的に互いに関係がある場合には、操作可能なように結合されるか、あるいは操作可能なように連結される。例えば、プロモーターは、それが配列の転写を調節している場合には、コーディング配列に操作可能なように結合されたり、あるいは、リボソーム結合部位は、それが翻訳できるように配置されている場合には、コーディング配列に操作可能なように結合される。

形質転換宿主細胞は、組換えDNA技術を用いて作製された本明細書に開示されて

いるDNA配列を含むベクターにより形質転換またはトランスフェクションされた細胞である。形質転換宿主細胞は、普通はケラチナーゼを発現するが、ケラチナーゼDNAをクローニングまたは増幅する目的で形質転換された宿主細胞は、ケラチナーゼを発現する必要はない。適切な宿主細胞には、本技術に精通する者にとって公知の原核生物宿主細胞のような宿主細胞が含まれる。

原核生物宿主細胞には、大腸菌 (*E. coli*) またはバチルス等のグラム陰性またはグラム陽性菌が含まれる。より高等な真核細胞には、下記の哺乳動物由来の確立された細胞系が含まれる。宿主細胞の例は、*E. coli* W3110 (ATCC 27,325)、*E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31,537)、*E. coli* 294 (ATCC 31,446) 等である。広範にわたる適切な原核細胞と微生物のベクターが利用可能である。*E. coli* は典型的にpBR322を利用して形質転換される。組換え微生物発現ベクターにおいて最も多く利用されるプロモーターには、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) およびラクトースプロモーター系 (Chang et al., *Nature* 275:615 (1978) ; およびGoeddel et al., *Nature* 281:544 (1979))、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddel et al., *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980) およびヨーロッパ特許公報第36,776号) およびtacプロモーター (H.De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21 (1983)) 含まれる。(原核宿主の発現に関する) プロモーターとシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列は、ケラチナーゼを

コードしているDNAに操作可能なように結合される。すなわち、これらは、DNAからのケラチナーゼメッセンジャーRNAの転写を促進するように配置されている。

培養酵母等の真核微生物も、本明細書に開示されている単離DNAを持つベクターにより形質転換できる。例えば、米国特許第4,745,057号を参照。パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、より下等な真核宿主微生物の中では最も多く利用されるが、多くの他の菌株も一般的に利用可能である。酵母ベクターには、2ミクロンの酵母プラスミドからの複製起点または自律複製配列 (ARS)、プロモーター、

本明細書に記載されているケラチナーゼをコードしているDNA、ポリアデニル化のための配列、および転写終結のための配列、および選択遺伝子を含む。プラスミドの例としてYRp7がある (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979) ; Kingman et al., Gene 7:141 (1979) 、Tschemper et al., Gene 10:157 (1980))

。

酵母ベクター内の適切なプロモーター配列には、メタロチオネインのプロモーター、3-ホスホグリセレートキナーゼ (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073 (1980) またはその他の解糖酵素 (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 (1968) およびHolland et al., Biochemistry 17:4900 (1978)) が含まれる。酵母での発現に利用される適切なベクターとプロモーターは、R. Hitzeman et al., ヨーロッパ特許公報第73,657号に詳細に記述されている。

C. ケラチナーゼ酵素の調製および利用法

上記のように、ケラチナーゼ酵素は、コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件で上記のように宿主細胞を培養し、発現されたケラチナーゼを収集することによって、作製できる。宿主細胞は、細胞が増殖する条件で培養され、次いでコードされたケラチナーゼの発現を誘発する条件で培養できる。あるいは、細胞はコードされたケラチナーゼの発現と増殖とを同時に誘発できる。ケラチナーゼは適切な分泌リーダー配列に融合できる。あるいは培養培地内で発現させ、培地から収集できる。あるいはケラチナーゼを細胞内で発現させ、次いで細胞を溶解し、細胞溶解物からケラチナーゼを収集できる。一般に、培養し

てトランスジェニックしたタンパク質を発現させる適切な技術は全て利用でき、これは本技術に精通する者にとって公知である。

調製されたケラチナーゼ酵素は、ケラチンに富む材料の分解処理工程に有用である。具体的な加水分解処理工程は、Shih et al. の米国特許第5,063,161号および第4,959,311号に記載されており、これらは引用することによってすべて本明細書に組み込まれるものとする。前記のShih et al. の特許は、ケラチナーゼ酵素

を含む発酵培地を開示している。従って、本発明のケラチナーゼ酵素は発酵培地の調製に有用である。

調製されたケラチナーゼ酵素は、羽毛の加水分解生成物の生産にも利用できる。羽毛の加水分解生成物には幾つか利用法がある。例えば、加水分解された羽毛は、動物飼料の成分として利用できる。同様に、調製されたケラチナーゼ酵素そのものを動物飼料調製品に組み込むことができる。Shih et al. の米国特許第5,186,961号には、ケラチナーゼ酵素を含む動物試料の適切な調製法が開示されている。Shih et al. の米国特許第5,186,961号は、引用することによってすべて本明細書に組み込まれる。

調製されたケラチナーゼ酵素は、背景技術において上述されているように、羽毛生成物からのアミノ酸生成にも有用である。

本発明は、以下の限定することを意図したものではない具体例に詳細に説明されている。具体例は説明だけを目的としており、発明の範囲を限定するものではない。

例1

PCR-ウォーキングによるバチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1からのケラチナーゼ遺伝子の単離と配列決定

本技術に精通する者にとって公知の技術に従って、臭化シアンを用いてケラチナーゼ酵素を切断する。その後、個々に対を成す一連のランダムプライマーと共に、N末端アミノ酸配列に対応する5'DNA (N10) 配列を固定プライマーとして使用し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う。N10の下流に位置する25-merオリゴ

ヌクレオチドプローブとのハイブリッド形成により、N10とランダムプライマーの1つによって増幅された683bpのPCR生成物が得られ、これはケラチナーゼ遺伝子を含む部分として同定される。遺伝子の3'末端部分も、+548の位置に設定され、ランダムプライマーと対をなす第二の固定プライマー (I10) を用いて、同じ方法

で増幅、配列決定される。上流の配列分析も同様の方法で実施した。575bpの上流領域は、ランダムプライマーと対を成すアンチセンス10-mer固定プライマー (R10) を用いて、PCRにより増幅される。バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) のケラチナーゼ遺伝子と調節要素を含む完全な1,457bpの配列は、PCR産物の組み合わせにより決定される。

図1に示すように、同定された遺伝子は、バチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) NCIB 6816のズブチリシンカールスベルグ遺伝子との類似性が高い。変更部分は、同定されたバチルス・リチェニフォルミス (*Bacillus Licheniformis*) のケラチン分解プロテアーゼの対応するアミノ酸配列の上に太字でアミノ酸のカールスベルグ遺伝子の違いとして明らかにされている。

配 列 表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: シー, ジェイソン・シー・エイチ
リン, シャン
ミラー, エリック・エス

(ii) 発明の名称: バチルス・リチェニフォルミス (Bacillus Licheniformis) PWD-1のケラチナーゼをコードしているDNA

(iii) 配列の数: 2

(iv) 連絡先:

(A) あて先: Kenneth D. Sibley
(B) 街: Post Office Drawer 34009
(C) 市: シャーロット
(D) 州: ノース・キャロライナ
(E) 国: アメリカ合衆国
(F) 郵便番号: 28234

(v) コンピュータ読取可能な形式

(A) 媒体: フロッピーディスク
(B) コンピュータ: IBM PC 互換器
(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 本出願データ:

(A) 出願番号: US 08/250,028
(B) 出願日: 1994年5月27日
(C) 分類:

(viii) 代理人の情報:

(A) 氏名: Sibley, Kenneth D.
(B) 登録番号: 31,665
(C) 参照番号: 5051-260

(ix) 電子通信の情報:

(A) 電話番号: (919)420-2200
(B) ファクシミリ番号: (919)881-3175

(2) 配列番号: 1

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1457塩基対
(B) 配列の型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源：
(A) 生物名： バチルス・リチニフォルミス (Bacillus Licheniformis)
(B) 株名： PWD-1

(ix) 配列の特徴：
(A) 存在を表す記号： CDS
(B) 存在位置： 215..1354

(xi) 配列： 配列番号1

CTCCTGCCAA GCTGAAGCGG TCTATTCATA CTTTCGAAC TGAACATTTTT CTAAAACAGT	60
TNNTAATAAC CAAAAAATTT TAAATTGGCC CTCCAAAAA ATAGGCCTAC CATATAATTC	120
ATTTTTTTTC TATAATAAAT TAACAGAATA ATTGGAATAG ATTATATTAT CCTTCTATTT	180
AAATTATTCT GAATAAAGAG GAGGAGAGTG AGTAATGATG AGGAAAAAGA GTTTTTGGCT	240
TGGGATGCTG ACGGCCTTCA TGCTCGTGTT CACGATGGCA TTCAGCGATT CCGCTTCTGC	300
TGCTCAACCG GCGAAAAATG TTGAAAAGGA TTATATTGTC GGATTTAAGT CAGGAGTGAA	360
AACCGCATCT GTCAAAAAGG ACGTCATCAA AGAGAGCGGC GGAAAAGTGG ACAAGCAGTT	420
TAGAATCATC AACGCAGCAA AAGCGAAGCT AGACAAAGAA GCGCTTAAGG AAGTCAAAAA	480
TGATCCGGAT GTCGCTTATG TGAAGAGGA TCATGTGGCC CATGCCTTGG CGCAAACCGT	540
TCCTTACGGC ATTCCTCTCA TTAAAGCGGA CAAAGTGCAG GCTCAAGGCT TTAAGGGAGC	600
GAATGTAAAA GTAGCCGTCC TGGATACAGG AATCCAAGCT TCTCATCCGG ACTTGAACGT	660
AGTCGGCGGA GCAAGCTTTG TGGCTGGCGA AGCTTATAAC ACCGACGGCA ACGGACACGG	720
CACACATGTT GCCGGTACAG TAGCTGCGCT TGACAATACA ACGGGTGTAT TAGGCGTTGC	780
GCCAAGCGTA TCCTTGACG CGGTTAAAGT ACTGAATTCA AGCGGAAGCG GATCATAACG	840
CGGCATTGTA AGCGGAATCG AGTGGGCGAC AACAAACGGC ATGGATGTTA TCAATATGAG	900
CCTTGGGGGA GCATCAGGCT CGACAGCGAT GAAACAGGCA GTCGACAATG CATATGCAAG	960
AGGGGTTGTC GTTGTAGCTG CAGCAGGGAA CAGCGGATCT TCAGGAAACA CGAATACAAT	1020
TGGCTATCCT GCGAAATACG ATTCTGTCAT CGCTGTTGGT GCGGTAGACT CTAACAGCAA	1080
CAGAGCTTCA TTTTCCAGTG TGGGAGCAGA GCTTGAAGTC ATGGCTCCTG GCGCAGGCGT	1140
ATACAGCACT TACCCAACGA AACTTATGC AACATTGAAC GGAACGTCAA TGGTTTCTCC	1200
TCATGTAGCG GGAGCAGCAG CTTTGATCTT GTCAAAACAT CCGAACCTTT CAGCTTCACA	1260
AGTCCGCAAC CGTCTCTCCA GCACGGCGAC TTATTTGGGA AGCTCCTTCT ACTATGGGAA	1320
AGGTCTGATC AATGTGGAAG CTGCCGCTCA ATAACATATT CTAACAAATA GCATATAGAA	1380

AAAGCTAGTG TTTTTCAGCAC TAGCTTTTTC TTCATTCTGA TGAAGGTTGT CCAATATTTT 1440
GAATCCGTTT CATGATC 1457

(2) 配列番号：2

(i) 配列の特徴：

- (A) 配列の長さ： 379アミノ酸
(B) 配列の型： アミノ酸
(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： タンパク質

(iii) ハイボセティカル配列： NO

(vi) 起源：

- (A) 生物名： バチルス・リチニフォルミス (Bacillus Licheniformis)
(B) 株名： PWD-1

(xi) 配列： 配列番号2

Met	Met	Arg	Lys	Lys	Ser	Phe	Trp	Leu	Gly	Met	Leu	Thr	Ala	Phe	Met
1			5					10						15	
Leu	Val	Phe	Thr	Met	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Pro
		20					25						30		
Ala	Lys	Asn	Val	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ile	Val	Gly	Phe	Lys	Ser	Gly	Val
		35				40						45			
Lys	Thr	Ala	Ser	Val	Lys	Lys	Asp	Val	Ile	Lys	Glu	Ser	Gly	Gly	Lys
	50				55						60				
Val	Asp	Lys	Gln	Phe	Arg	Ile	Ile	Asn	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Leu	Asp
65					70				75					80	
Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Asn	Asp	Pro	Asp	Val	Ala	Tyr	Val
			85					90						95	
Glu	Glu	Asp	His	Val	Ala	His	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	Val	Pro	Tyr	Gly
			100					105					110		
Ile	Pro	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Val	Gln	Ala	Gln	Gly	Phe	Lys	Gly
		115				120						125			
Ala	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	His
	130					135					140				
Pro	Asp	Leu	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Ala
145				150					155					160	
Tyr	Asn	Thr	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val
			165					170						175	

Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val
 180 185 190
 Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr
 195 200 205
 Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp
 210 215 220
 Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro
 260 265 270
 Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser
 275 280 285
 Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala
 290 295 300
 Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Thr Ser Met Val Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala
 325 330 335
 Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn
 340 345 350
 Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln
 370 375

【図1A】

PWD-1 CTCTGCCAAGCTGAAGGGTCTATTCATACATTTCTTAAACAGTTNNIAATAACCAAAAATTTTAAATGGCC 90
CTCCAAAAAATAGGCCJACCATATAATTCATTTTTTCTATAATAATTAACAGATAATGGAATAGATTATTAICCTTCTATT 180
Carlsberg
AAATTATCTGAATAAGAGGAGAGTGAATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCCTTCACTGCTGTT 270
M M R K K S F W L G M L T A F M L V F
Preproprotein
T M A F S D S A S A A Q P A K N V E K D Y I V G F K S G V K
CAGATGGCATTCAGCGATTCCGCTTCTGCTCAACCGCGGAAAAATGTTGAAAAGGATTATATTGTCGGATTAAAGTCAGGAGTGAA 360
T A S V K K D V I K E S G G K V D K Q F R I I N A A K A K L
128
AACCGCATCTGTCAAAAAGGACGTCAATCAAGAGAGCGCGGAAAAAGTGGACAAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCAGCAAAAGCGAAGCT 450
D K E A L K E V K N D P D V A Y V E E D H V A H A L A Q T V
AGACAAAGAAAGCGCTTAAGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAGAGGATCATGTGGCCCATGCTTGGCGCAACCGT 540
P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G
TCCTTACGGCATTCCTCTCATTAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTAAAGGAGCGAATGTAAAGTAGCCGTCCTGGATACAGG 630
I Q A S H P D L N V V G G A S F V A G E A Y N T D G N G H G
AATCCAAGCTTCTCATCCGGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGACGCGCAACGGACCGG 720
T H V A G T V A A L D N T T G V L G V E P S V S L Y A V K V
CACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGGCTTGACAATACAACGGGTGATAGGCGTGGCGCAAGCGTATCCTTGTACGGGTAAAGT 810

FIG. 1A.

L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D V I N M S
ACTGAATTCAGCGGAGCGGATCATACAGCGGCATTGTAGCGGATCGAGTGGCGACAAACGGCAITGGATGTTATCAATATGAG 900
P128
L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V A A A G N
CCTTGGGGAGCATCAGGCTCGACAGCGGATGAACAGGCAGTGCACATATGCAAGAGGGTTCGTTGTAGCTGCAGCAGGGAA 990
S G S S G N T N T I G Y P A K Y D S V I A V G A V D S N S N
CAGCGGATCTTCAGGAACAGCAATACAATTGGCTATCCTCGGAATACGATTCTGTCAICGCTGTGGTGGGTAGACTCTAACAGCAA 1080
R A S F S S V G A E L E V M A P G A G V Y S T Y P T N T Y A
CAGAGCTTCATTTCCAGTGTGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCTGGCGAGGGGTATACAGCACTTACCCAAACGAACTTATGC 1170
T L N G T S M V S P H V A G A A L I L S K H P N L S A S Q
AACATTGAACGGAACGTCATGGTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTGTATCTGTCAAAACATCCGAACCTTTCAGCTTCACA 1260
V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
AGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCAGCGGACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAGGCTGTGATCAATGTCGAAGCTGCCGCTCA 1350
stop
ATAACATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAGCTAGIGTTTTTAGCACIAGCIIITTCATCTCTGATGAAGGTGTCCTCAATATTT 1440
GAATCCGTTCCATGATC 1457

FIG. 1B.

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年5月20日

【補正内容】

請求の範囲（補正）

1. 配列番号1のDNA配列を持ち、ケラチナーゼをコードしている単離DNA分子。
。
2. ベクターDNAと、配列番号2のアミノ酸配列を持つケラチナーゼ酵素をコードしている上記請求項1記載の単離DNAとを含む組換えDNA分子。
3. 請求項2記載の組換えDNAを含み、配列番号2のアミノ酸配列を持つケラチナーゼ酵素を発現できる宿主細胞。
4. コードされているケラチナーゼを発現させることが可能な条件下で請求項3記載の宿主細胞を培養して細胞培養物を得る工程と、上記細胞培養物から上記ケラチナーゼ酵素を収集する工程とを含むケラチナーゼ酵素の製造方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 95/05635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/57 C12N9/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO-A-89 09278 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 5 October 1989 see page 8, line 24 - page 11, line 33 ---	1-10
A	POULTRY SCIENCE, vol. 70, no. 1, 1991 page 74 XIANG LIN ET AL. 'Isolation of a feather-degrading keratinase from Bacillus licheniformis PWD-1.' see the whole document --- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1995

Date of mailing of the international search report

20.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 581 & Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 95/05635

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 61, no. 4, April 1995 pages 1469-1474, XIANG LIN ET AL. 'Nucleotide sequence and expression of <i>kerA</i>, the gene encoding a keratinolytic protease of <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> PWD-1.' see abstract see page 1472, right column, paragraph 1 - page 1473, right column, paragraph 2; figure 9</p> <p>-----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 95/05635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8909278	05-10-89	US-A- 4959311	25-09-90
		JP-T- 3504676	17-10-91
		US-A- 5063161	05-11-91
		US-A- 5171682	15-12-92
<hr/>			

